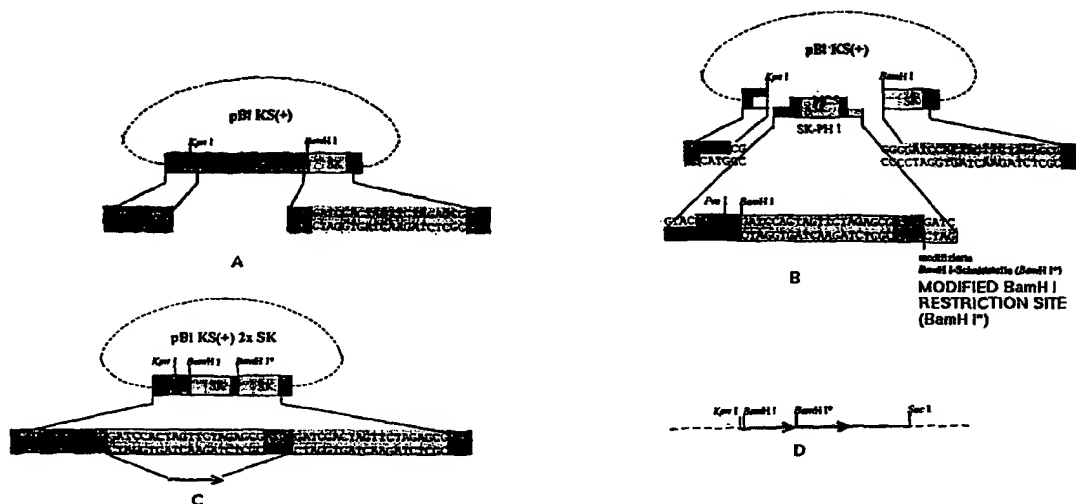


**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : <b>C12N 15/70, C12Q 1/68, C12N 5/10</b>	<b>A2</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/40736</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. Juli 2000 (13.07.00)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00116</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 7. Januar 2000 (07.01.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 00 511.7 8. Januar 1999 (08.01.99) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BUB, Sabine [DE/DE]; Birkenstrasse 37, D-76661 Philippsburg (DE). TRÖSTER, Helmut [DE/DE]; Leibnitzstrasse 4, D-68165 Mannheim (DE). RICHTER, Karsten [DE/DE]; Veilchenweg 20, D-68775 Ketsch (DE). HAKING, Ansgar [DE/DE]; Haupt- strasse 60, D-69214 Eppelheim (DE). RADDATZ, Stefan [DE/DE]; Wörthstrasse 5, D-69115 Heidelberg (DE). WIESSLER, Manfred [DE/DE]; Wilhelm-Mayer-Strasse 2, D-67227 Frankenthal (DE). SPIESS, Eberhard [DE/DE]; Stahlbühlring 15, D-68526 Ladenburg (DE). TRENDE- LENBURG, Michael [DE/DE]; Im Inszenbühl 21, D-69221 Dossenheim (DE).</p>		<p>(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Trudering Strasse 246, D-81825 München (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>

(54) Title: MOLECULAR-BIOLOGICAL MARKER FOR ANALYTICAL ELECTRON MICROSCOPY

(54) Bezeichnung: MOLEKULARBIOLOGISCHE MARKER FÜR DIE ANALYTISCHE ELEKTRONENMIKROSKOPIE

**(57) Abstract**

The invention relates to a plasmid that is characterized in that it is derived from pBluescript KS(+) and that it contains 1, preferably 2, 7, 14, 21 and 27, repetitive SK primer elements. The invention also relates to the use thereof for analytical electron microscopy.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Plasmid, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es sich von pBluescript KS(+) ableitet und mehr als 1, bevorzugt 2, 7, 14, 21 und 27, repetitive SK-Primerelemente enthält, sowie dessen Verwendung in der analytischen Elektronenmikroskopie.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## **Molekularbiologische Marker für die analytische Elektronenmikroskopie**

Die Erfindung betrifft eine Serie neuer Plasmide auf der Basis von pBluescript KS(+) mit mehr als 1 SK-Primersequenzelement, bevorzugt mit 2, 7, 14, 21 und 27 repetitiven SK-Primersequenzelementen, sowie deren Verwendung als molekularbiologischer Marker für die analytische Elektronenmikroskopie.

Das Electron Spectroscopic Imaging (ESI) ist ein Verfahren der analytischen Elektronenmikroskopie (EM), bei dem die Verteilung eines bestimmten chemischen Elements im untersuchten Präparat bildlich dargestellt wird. Um die strukturellen Organisationen biologischer Systeme zu erhellen, müssen die einzelnen makromolekularen Komponenten optisch unterscheidbar sein. Gegenwärtig wird zur Markierung von Makromolekülen für die Elektronenmikroskopie die Beladung mit Goldpartikeln oder anderen Teilchen verwendet, die im Beugungskontrast sichtbar sind.

Bisher werden Mehrfachmarkierungsexperimente in der Elektronenmikroskopie so durchgeführt, dass man Goldkörner unterschiedlicher Grösse verwendet, um die verschiedenen Zielstrukturen in demselben Präparat unterscheiden zu können. Beispielsweise würde in einem Doppelmarkierungsexperiment ein Molekültyp mit 5nm grossen Goldkörnern, der andere mit 10-20nm grossen gekoppelt werden, um sicher zu sein, dass bei der späteren Auswertung die verschiedenen Moleküle eindeutig lokalisiert und voneinander unterschieden werden können. Grosse Goldkörner (grösser als 10nm) bringen Nachteile mit sich, weil deren Eindringvermögen in Gewebe und deren Kopplungseffizienz an das Zielmolekül reduziert sind (Giberson, R.T., und Demaree, R.S: The influence of immunogold particle size on labeling density. Microscopy Research and

Technique, 27, 355-357, 1994); ausserdem lässt sich eine solch grosse Struktur nicht mehr eindeutig dem Ort der Bindung an die Zielstruktur zuordnen, d.h. man verliert an Auflösungsvermögen. Würde man ein Dreifachmarkierungsexperiment planen, würden sich diese Nachteile besonders stark bemerkbar machen. Eine Alternative zu den Goldkörnern bieten nur sog. Ferritinmoleküle, grosse Proteineinheiten, die Hunderte von Eisenatomen im Zentrum enthalten und an Zielstrukturen koppelbar sind. Deren Elektronendichte und damit die Detektierbarkeit im Transmissionselektronenmikroskop sind allerdings so schlecht, dass ihre Anwendung sich nur in den seltensten Fällen als praktikabel erwiesen hat.

Demgegenüber existieren im Bereich der Lichtmikroskopie seit einiger Zeit Fluoreszenzverfahren, die vergleichsweise problemlos die Dreifachmarkierung, ja sogar die Vierfachmarkierung ermöglichen. Da die Elektronenmikroskopie auf dem Sektor der Markierungstechniken mit der Lichtmikroskopie momentan nicht konkurrieren kann, begnügen sich die Wissenschaftler mit dem vergleichsweise schlechten Auflösungsvermögen der Lichtmikroskope, bevor sie die Nachteile der Markierungstechnologie auf dem elektronenmikroskopischen Sektor in Kauf nehmen. Mit der Entwicklung alternativer Markierungstechniken zur Goldmarkierung würde die Elektronenmikroskopie an Attraktivität gewinnen, weil die Konkurrenzfähigkeit bezüglich der Markierung einherginge mit einem mehr als 100 mal so guten Auflösungsvermögen wie es die Lichtmikroskopie ermöglicht. Als Alternative zum Markierungsverfahren mit Gold für konventionelle Transmissionselektronenmikroskopie, das auf der Elektronendichte des Schwermetalls Gold basiert, besteht ein Bedarf für Markierungsverfahren für ESI. Diese Technik nutzt andere Wechselwirkungen der Strahlelektronen mit den Atomen im Präparat aus als die konventionelle Transmissionselektronenmikroskopie. Es lassen sich im Prinzip alle Elemente spezifisch nachweisen. Damit erweitert sich der Kreis der Elemente, die für Markierungsverfahren in Frage kommen.

Entscheidend für die Etablierung alternativer Markierungsverfahren ist allerdings die Überprüfung von Detektionslimits für die in Frage kommenden Elemente. D.h. konkret, dass man Informationen über die Anzahl detektierbarer Elementatome pro nm<sup>2</sup> Fläche im Präparat braucht. Es geht also um die Nachweisgrenzen der ESI-Technik. Zu diesem Parameter gibt es bisher wenig Untersuchungen und ungenaue Angaben. Die ESI-Technik wird zwar häufig genutzt; trotzdem wurden bisher keine Daten zu Detektionsgrenzen veröffentlicht.

Es besteht also ein Bedarf nach alternativen Markierungsmöglichkeiten für die Elektronenmikroskopie. Die Detektierbarkeit eines solchen Markerkomplexes sollte leicht getestet und beurteilt werden können.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, eine Möglichkeit bereitzustellen, mit der vor zeitaufwendigen zell- und molekularbiologischen Versuchen Daten erhalten werden können, anhand derer die Aussichten des geplanten Experiments mit dem in Frage kommenden Element bzw. der in Frage kommenden Markerstruktur beurteilt werden können. Ferner soll der Parameter der detektierbaren Anzahl an Elementatomen pro Flächeneinheit messbar werden, um daraus die notwendigen Informationen für die Etablierung von EM-Markierungsverfahren zu erhalten.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Gegenstände der beigefügten Patentansprüche.

Die Ursache für die Notwendigkeit oben erwähnter Vorversuche liegt darin begründet, dass bis heute für die ESI-Detektion der verschiedenen chemischen Elemente keine genauen Grenzwerte der Detektierbarkeit bekannt sind. Der Grund ist unter anderem der, dass die Präparation einer geeigneten Testprobe nicht trivial ist. Eine solche Probe muss besondere Eigenschaften aufweisen. Es muss Bereiche geben, in denen das Zielelement in einer klar definierten Menge vorhanden ist. Diese Bereiche müssen eindeutig zu erkennen sein. In allen übrigen Bereichen

darf das Zielelement nicht auftreten. Diese Problematik lässt sich anhand der Publikation von Golla, U. und Kohl, H. (Micron, 28 (5), 397-406, 1997) aufzeigen, in der versucht wurde, die Auflösung und die Detektierbarkeit am Beispiel Uran  
5 mittels körniger Präzipitate zu dokumentieren.

Erfindungsgemäß wurde eine Serie neuer Plasmide mit mehr als 1, bevorzugt 2, 7, 14, 21 und 27 SK-Primersequenzelementen in direkter Kopf/Schwanz orientierter Repetition auf der Basis  
10 von pBluescript KS(+) hergestellt. Das ringförmig geschlossene Plasmid liegt als Zielstruktur vor, in der eine kurze DNA-Sequenz (SK-Primersequenzelement) repetitiv enthalten ist. Das SK-Primersequenzelement umfaßt folgende Sequenz:

15 5'-GATCCACTAGTTCTAGAGCG-3'.

Die SK-Primersequenz stellt einen Abschnitt von 20 Nukleotiden dar, der von der Fa. Stratagene in den von ihnen angebotenen Vektoren pBluescript KS(+/-) sowie Bluescript SK (+/-) so bezeichnet wird und in der "multiple cloning site" (MCS)  
20 liegt. pBluescript ist ein Plasmidvektor, der von der Fa. Stratagene verkauft wird. Es handelt sich um ein ringförmiges DNA-Molekül, das die für die Vermehrung in E.coli notwendigen genetischen Informationen enthält. Für die Klonierung von Fremd-DNA-Abschnitten in diesen Vektor entscheidend ist die  
25 "multiple cloning site" (MCS). In diese MCS-Region wurden erfindungsgemäß die oben genannten SK-Primersequenz-Repetitionen einbaut, so daß sich die entstehenden Plasmide von pBluescript nur in der MCS unterscheiden, d.h. sich von  
30 pBluescript ableiten.

An diese Repetitionssequenz kann eine homologe Sequenz durch Hybridisierung gebunden werden. Trägt diese hybridisierende Sequenz einen Markerkomplex, gelangt durch Hybridisierung der  
35 Marker an die Zielstruktur.

Die hybridisierende Sequenz, nachfolgend SK-Oligonukleotid bzw. SKO genannt, kann an den Enden chemisch modifiziert sein,

um eine kovalente Bindung unterschiedlicher Marker zu erlauben. Damit können beliebige Markierungsstrategien untersucht werden. An das SKO kann ein Molekül gekoppelt werden, das ein Element in möglichst hoher Konzentration enthält, dessen Tauglichkeit als Marker für ESI man überprüfen will. Es eignen sich Bor-Marker wie sie beispielsweise in der deutschen Patentanmeldung 198 03 206.4 beschrieben sind. Weitere erfolgversprechende Marker sind Silizium sowie Eisen und Mangan. Die Markerverbindung wird in einer kontrollierten Synthese so aufgebaut werden, dass die Anzahl an Zielelementatomen bekannt ist und das Zielelement in möglichst grosser Menge im Zentrum der Markerverbindung vorliegt. Sie kann ausserdem als Einheit an das SKO gekoppelt werden. Zur Erfüllung dieser Erfordernisse wird beispielsweise die Bor-Markerstruktur so synthetisiert, dass sie wie eine Nukleosid-Einheit in der Oligonukleotidsynthese behandelt wird. Der bevorzugte Weg der Kopplung sieht also die Herstellung einer Borverbindung vor, die die notwendigen Schutzgruppen und Kopplungsgruppen für die Oligonukleotidsynthese nach dem Phosphoramidit-Verfahren enthält, in dessen Verlauf ein Oligonukleotid, vom 3'-Ende zum 5'-Ende hin, Baustein für Baustein, aufgebaut wird. Es besteht dabei die Möglichkeit, daß dazu im letzten Schritt an das 5'-Ende des SKO der Borkomplex alleine oder in Form eines 5'-Bor-Nukleotid(C)-3'-Bausteins angehängt wird (s. dazu auch deutsche Patentanmeldung 19803206.4). Vorteilhaft ist es, wenn der Marker-haltige Baustein einen Abstandhalter (Spacer) enthält, der den Markerkomplex vom SKO abstehen lassen wird, um die Hybridisierung des markierten SKO gegen die komplementären Plasmidbereiche nicht zu behindern. Als Spacer kommen aliphatische Kohlenwasserstoffketten mit Längen zwischen  $C_2$  und  $C_{10}$  in Frage, die eventuell Sauerstoffgruppen in Form von Etherbrücken (vorzugsweise maximal 5 Stück) enthalten können (siehe dazu auch deutsche Patentanmeldung 198 03 206.4). In vergleichbarer Weise kann auch mit beliebigen anderen Markerstrukturen, jeweils ein anderes Zielelement enthaltend, verfahren werden.

Die markierten Oligonukleotide werden an die DNA hybridisiert und liegen im Präparat selektiv dort vor, wo die ringförmigen DNA-Moleküle liegen. Je nach Repetitionsgrad der SK-Elemente auf den verwendeten Plasmidmolekülen werden also variable aber definierte Mengen an Zielelementatomen in dichtester Anordnung an der DNA hängen. Man kann deshalb von einer dichtesten Packung ausgehen, weil gefunden wurde, daß die Abstände der Markerstrukturen an der DNA 8 nm betragen. Dies ergibt sich aus der Berechnung der Ausdehnung doppelsträngiger DNA-Bereiche über die in den Plasmiden vorliegenden SK-Repetitionseinheiten. Da die Markerstruktur einen Durchmesser von maximal 5 nm haben wird, bleibt zwar etwas Raum zwischen den Markern frei; dieser Raum sollte allerdings erhalten bleiben, weil die Hydrathülle der Markerverbindungen berücksichtigt werden muss.

Das erfindungsgemäße Plasmid wird gespreitet auf die Trägermatrix des Probenhalters für das ESI präpariert. Die obigen Plasmide erlauben die Präparation einzelsträngiger, ringförmiger Plasmid-DNA-Moleküle nach Infektion plasmidhaltiger *E. coli*-Zellen, bevorzugt *E. coli* JM 110, mit einem sogenannten Helfervirus. Das (+)-Zeichen im Namen des Ursprungsplasmids pBluescript KS (+) gibt an, dass nur der + - Strang des Plasmidmoleküls isoliert wird. Nun steht eine einzelsträngige DNA-Probe zur Verfügung, gegen die, ohne das sonst notwendige Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs, sofort komplementäre DNA-Bereiche hybridisiert werden können. Um gegen den + - Strang der Plasmide komplementäre SK-Oligonukleotide (SKO) zu hybridisieren, müssen diese naturgemäss die Sequenz des - - Strangs darstellen, d.h. 5'-CGCTCTAGAACTAGTGGATC-3'. Ein solches Oligonukleotid kann mittels automatischer Oligonukleotidsynthese hergestellt werden. Diese Moleküle werden in einer wässrigen Lösung mit einem der obengenannten Einzelstrang-Plasmidmoleküle gemischt. Es bilden sich an den Stellen Doppelstrangbereiche, wo die SK-Oligonukleotide (SKO) den komplementären Partner auf der Einzelstrang-DNA gefunden haben, also SK-Oligonukleotid/Plasmid-Hybride (nachfolgend SKOPH genannt). Um die



Bindung der einzelnen SKOs an die DNA nicht zu behindern, wird vorzugsweise als Abstandshalter zwischen den SK-Oligonukleotid-Bindungsstellen die Lücke von 4 Nukleotiden vorgesehen.

5

10

15

20

25

Diese SKOPHS werden vorzugsweise durch Chromatographie von ungebundenen SKOs getrennt. Dies kann durch Säulenchromatografie geschehen, z.B. werden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) Säulenmatrices angeboten (beispielsweise Sephadex oder Sepharose). Die gesäuberten SKOPHS werden dann einer Spreitung unterzogen. Dabei werden ansonsten geknäuelte DNA-Moleküle so vorbehandelt, dass sie in Lösung gestreckt sind und in diesem Zustand auf mit dünner Folie beschichtete elektronenmikroskopische Trägernetzchen aufgetragen, durch Behandlung mit Schwermetallen sichtbar gemacht und im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) analysiert. Falls eine ESI-Analyse vorgesehen ist, sollte die Schwermetall-Behandlung entfallen, da jedes Element, das in hohen Mengen und/oder Konzentrationen im Präparat vorkommt, den spezifischen Nachweis des Zielelements stört oder unmöglich macht. Die DNA-Ringe werden nun gleichmässig über die Oberfläche des TEM-Präparats verteilt sein und einzeln liegen. Damit sind die obengenannten Grundvoraussetzungen erfüllt: Die ringförmige DNA ist eindeutig erkennbar, an die DNA gebunden liegen die SKOs in mehr oder weniger grosser Zahl vor und zwischen den DNA-Bereichen ist (annähernd) nichts.

30

35

Falls unklar sein sollte, ob die SKOs an die repetitive Region gebunden wurden, bestehen zwei Kontrollmöglichkeiten: a) man verwendet durch Digoxigenin oder Biotin an der 5'-Position markierte SKOs, gegen die ein anti-Digoxigenin oder ein anti-Biotin-Antikörper eingesetzt wird, der selbst goldmarkiert ist und mit herkömmlicher TEM nachweisbar ist; die Goldkorngrösse darf allerdings ca. 6 nm Durchmesser nicht überschreiten (ansonsten könnten sich die Goldkörner gegenseitig behindern); b) evtl. in Kombination mit a) kann das repetitive Zielplasmid durch Restriktionsendonuklease-Verdau neben der repetitiven SK-Region linearisiert werden, so dass nach Spreitung die

Bindungsorte der SKOs sofort dadurch identifizierbar sind, dass sie am Ende eines fadenförmigen DNA-Moleküls liegen müssen. Da Restriktionsendonukleasen nur Doppelstrang-DNA schneiden, muss man dessen Schnittstelle allerdings zuerst  
5 durch Hybridisierung eines um die Schnittstelle herum komplementären Oligonukleotids doppelsträngig machen.

Die repetitiven Sequenzen sind dicht hintereinander angeordnet und erstrecken sich etwa über ein Drittel des Plasmids. Durch  
10 diese repetitiven Sequenzen erhöht sich die Signifikanz des Tests stark. Der Vorteil der oben beschriebenen Plasmide besteht darin, dass zwischen einem und 27 der Markereinheiten angehäuft werden können, um so die Zahl an Markerelementatomen zu modulieren. Gelingt es, die markierten SKOPHS in  
15 unterschiedlichen Spreitungszuständen von vollständig gestreckt bis geknäuelte im Spreitungspräparat darzustellen, können die Zielelementatome, besonders an geknäuelte DNA-Moleküle gebunden, i) auf engstem Raum konzentriert, ii) wegen der gleichmässig fibrillären Ringform der daran gebundenen DNA  
20 lokalisierbar, iii) in definierter, aber variabler Anzahl und iv) in ansonsten elementfreier Umgebung analysiert werden.

DNA-Abschnitte ausserhalb der Repetitionsbereiche, an die kein Marker binden kann, dienen als Negativkontrolle für die ESI-  
25 Elementdetektion. Eine solche Negativkontrolle ist notwendig, weil die Spezifität einer errechneten Zielelement-Verteilung angezweifelt werden könnte, wenn man keine Vergleichsregion ohne Zielelement und dementsprechend ohne errechnetes Elementsignal zeigen könnte. Da der Test ein  
30 molekularbiologisches System darstellt, erfolgt die Bewertung des Markers in seiner physikalisch-chemischen Umgebung. D.h. auch, dass der Test einer medizinisch/biologischen Anwendung, speziell der *in situ*-Hybridisierung, sehr nahe kommt.

35 Ziel des Testverfahrens ist es, zuverlässige Daten über die für eine ESI-Detektion notwendige Mindestzahl an Zielelementatomen pro Flächeneinheit zu erhalten. Gleichzeitig erhält man Daten über die Einzelerkennbarkeit der

Markerstruktur, weil aufgrund der Repetition derselben eine Mittelung auch schwacher elementspezifischer Signale möglich ist, besonders an DNA-Molekülen, die vollständig ausgestreckt im elektronenmikroskopischen Präparat vorliegen. Somit lässt sich vor einem technisch aufwendigen Einsatz einer Markerstruktur in der Medizin oder Biologie bereits feststellen, ob gegebenenfalls die Zahl oder/und die Konzentration an Zielelementatomen in der Markerstruktur noch erhöht werden muss. Erfahrungsgemäss finden sich in Spreitungspräparaten alle Plasmidzustände von ausgestreckt bis stark geknäuelte, besonders wenn die Spreitung nicht optimal verlaufen ist. Dieser normalerweise unerwünschte Fall ist im Zusammenhang mit der erläuterten Bestimmung der Element-Detektionsgrenzen von Vorteil.

Spreitungsmethoden finden sich mit vielfältigen Variationen in der Literatur (für eine Zusammenfassung s.: Electron Microscopy in Molecular Biology; a practical approach, Sommerville, J. und Scheer, U. (eds.), IRL Press, 1987).

Mit den Standardverfahren der Elementdetektion mittels ESI lassen sich die Schwellenwerte für den elementspezifischen Nachweis ermitteln. Dazu existiert bisher kein anderes Verfahren. Es lässt sich deshalb vorstellen, dass dieses Verfahren auch für solche wissenschaftlich tätigen Personen von Interesse ist, die keine biologisch/medizinische Anwendung im Auge haben, sondern an den Nachweisgrenzen beliebiger anderer als der erwähnten chemischen Elemente interessiert sind. Voraussetzung ist, dass das Zielelement bereits in der an das Oligonukleotid gekoppelten Markerstruktur so konzentriert wie möglich und in möglichst hoher Menge vorliegt.

Die Anwendung für ESI wurde vorstehend ausführlich beschrieben. Daneben sind auch Anwendungen von Teilen des Testsystems möglich, die über die Anwendung in der Elektronenmikroskopie hinausgehen. Zwei weitere Anwendungsbeispiele sind hier kurz erwähnt und werden weiter unten genauer beschrieben: 1) die SK-Primer-Repetitions-kassette

lässt sich mittels Hybridisierung markierter Oligonukleotide allgemein zur effizienten und lokalisierten DNA-Markierung nutzen; 2) zur Untersuchung der Mechanismen zur Deletion von direkten Repetitionen in DNA bilden die nachstehend beschriebenen Plasmide das ideale Substrat.

Über die Anwendung im Bereich der Elektronenmikroskopie hinaus, bieten, wie vorstehend bereits erwähnt, die genannten Repetitionsbereiche die Möglichkeit, DNA ganz allgemein auch mit solchen SKO- gekoppelten Markern nach Hybridisierung detektierbar zu machen, die als Einzelmoleküle noch unterhalb der Detektionsgrenze liegen, aber in repetitiver Anordnung nachweisbar werden. Dazu könnten die Repetitionsbereiche auch in die gewünschten DNA-Moleküle über *Sac* I/ *Kpn* I-kompatible Enden umklontiert werden. Mit einem solchen Verfahren könnte beispielsweise der Weg von DNA nach Einführung in eine Zelle (Transfektion) verfolgt werden. Dabei kommen sowohl licht- als auch elektronenmikroskopische Anwendungen in Frage.

Die chemische Modifizierbarkeit der hybridisierenden Sequenz erlaubt variable Einsatzmöglichkeiten des Tests für unterschiedlich konfigurierte Markereinheiten. Da der Test ein molekularbiologisches System darstellt, erfolgt die Bewertung des Markers in seiner physikalisch-chemischen Umgebung. Getestet wird die Einzelerkennbarkeit des Markers. Die Stärke schwacher Signale kann durch Mitteilung genau bestimmt werden.

Die folgenden Ausführungen zur Herstellung der unterschiedliche Repetitionen enthaltenden Plasmide zeigen, dass für die Versuche zur eigentlichen Elementdetektion für ESI prinzipiell die Repetitionsstufen (pBluescript KS (+)), 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 14x, 21x sowie 27x SK zur Verfügung stehen. Da die Analyse von Unterschieden zur Detektierbarkeit des Zielelements mit ESI besonders überzeugend ausfallen wird, wenn die Zahl an analysierten Elementatomen stark schwankt (s. dazu Ausführungen unten), sind die Repetitionsgrade 2x, 7x, 21x und 27x SK von besonderem Interesse.

Wie bereits erwähnt, basiert die vorliegende Erfindung darauf, daß in einem Testpräparat Bereiche vorhanden sind, in denen das Zielelement in einer klar definierten Menge vorhanden und eindeutig zu erkennen ist; in allen übrigen Bereichen darf das Zielelement nicht auftreten.

Die Plasmidkonstruktion wird durch Einschleusung in einen  $dam^-$ / $dcm^-$ -Stamm (vorzugsweise *E. coli* JM 110) stabilisiert. JM110 ist  $dam^-$ / $dcm^-$  und enthält ansonsten keine auffälligen genotypischen Marker, die diesen Stamm von den anderen verwendeten deutlich unterscheiden würden, so daß auch diese verwendet werden können. Die Einschleusung der erfindungsgemäßen repetitiven Plasmide in den  $dam^-$ / $dcm^-$ -Stamm erfolgt gemäß Standardmethoden (vgl. Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.: Molecular cloning; A laboratory manual; Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Überraschenderweise wird dadurch eine Deletion der direkt repetitiven Elemente während der Bakterienvermehrung vermieden. Es ist nämlich eigentlich bekannt, daß direct repeats oder inverted repeats während der Vermehrung in *E. coli* verloren gehen.  $dam^-$ / $dcm^-$ -Stämme sind in der Literatur dokumentiert (vgl. Marinus et al., J. Bacteriol. 114 (3), 1143-1150 (1973)), eine Stabilisierung direkt-repetitiver Sequenzen dadurch wurde jedoch noch nie beschrieben.

In *E. coli* JM110 konnte der Repetitionsgrad sogar auf 27x gesteigert werden. Darüberhinaus ist die Kombination von *E. coli* JM110/pBl KS (+) 27xSK erstmalig ein System, in dem eine ansonsten in *E. coli* instabile direkte Repetitionssequenz vermehrt werden kann. Für Bakteriengenetiker eröffnet sich die Möglichkeit, die zugrunde liegenden Mechanismen dieses Typs von Deletionen in Bakterien zu analysieren und die beteiligten Komponenten zu charakterisieren. Die Frage der Stabilisierung von Repetitionen eines solchen Typs in *E. coli* ist beispielsweise für Klonierungsspezialisten von Interesse, die menschliche DNA-Abschnitte in ihrem Ursprungszustand erhalten wollen, auch wenn diese in *E. coli* vermehrt worden waren (siehe z. B. Human Genome Project). Der Hintergrund ist der,

dass auch in menschlichen DNA-Abschnitten kurze, direkt-repetitive Abschnitte vorkommen, die vergleichbar schlecht stabilisierbar sein können wie die oben geschilderte SK-Primersequenz-Repetition.

5

10

15

20

25

30

Die erfindungsgemäßen Plasmide können zu Testkits zur Verwendung in der Elektronenmikroskopie zusammengestellt werden. Ein Testkit enthält z.B. folgende Materialien: 1) kompetente E. coli JM110-Bakterienzellen zur Vermehrung der repetitiven Plasmide; 2) die einzelsträngigen Plasmide 1x oder 2x, 7x, 14x, 21x und 27x SK zur differentiellen Analyse von Markerstrukturen für das Elektronenmikroskop; 3) elektronenmikroskopische Trägernetzchen, die für die Spreitung bereits beschichtet sind; 4) durch Biotinylierung oder Digoxigenierung am 5'-Ende markierte SK-Oligonukleotide, die dazu dienen, die Hybridisierung und Spreitung zu optimieren, indem man mit einem goldgekoppelten anti-Biotin- bzw. anti-Digoxigenin- Antikörper nachweist, dass die repetitive Anordnung am Plasmid tatsächlich vorliegt; 5) eine Vorschrift, die die einzelnen Arbeitsschritte beschreibt. Falls ein Interesse an anderen als den ESI-abhängigen Anwendungen bestehen sollte, kann für solche Interessenten der Testkit modifiziert werden.

Die Plasmide mit 2, 7, 14, 21 und 27 SK-Primersequenzelementen wurden als E.coli-Kulturen am 22. Dezember 1998 bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Mascheroder Weg 1, Braunschweig unter den Hinterlegungsnummern DSM 12600, DSM 12601, DSM 12602, DSM 12603 und DSM 12604 hinterlegt:

35

pBI KS(+)2xSK	DSM 12600
pBI KS(+)7xSK	DSM 12601
pBI KS(+)14xSK	DSM 12602
pBI KS(+)21xSK	DSM 12603
pBI KS(+)27xSK	DSM 12604

Die folgenden Figuren erläutern die Erfindung näher.

**Figur 1: Überblick über die Herstellung von pBl KS(+) 2x SK.**  
Die hier gewählte Art der Darstellung wird in den folgenden Abbildungen dieses Typs fortgeführt. Die Multiple Klonierungsstelle (MCS) ist als dunkelgrauer Block dargestellt, die darin enthaltene SK-Primer-Sequenz ist hellgrau unterlegt. Die Schnittstellen sind mit einer fein unterbrochenen Linie gekennzeichnet. Die detaillierte Sequenz ist von den für die Klonierung wichtigen Abschnitten angegeben.

- a) Schematische Darstellung von pBl KS(+). Für die nachfolgende Klonierung wurde pBl KS(+) mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I und *Bam*H I verdaut. Die Restriktionsschnittstellen sind mit einer fein unterbrochenen Linie gekennzeichnet. Das dazwischenliegende MCS-Fragment fällt heraus.
- b) Schematische Darstellung des mit *Bam*H I und *Kpn* I verdauten pBl KS(+) und dem SK-PH I-Fragment, das durch Ligation mit pBl KS(+) zu pBl KS(+) 2x SK führen sollte. Durch den Verdau mit *Kpn* I und *Bam*H I wurde ein Teil des MCS herausgetrennt (s. auch a), im Gegenzug wurde das Fragment SK-PH I insertiert. Durch SK-PH I wurde die zuvor vorhandene *Bam* H I-Schnittstelle mittels Modifizierung eines Basenpaars (fette Buchstaben) maskiert und gleichzeitig eine neue *Bam*H I-Schnittstelle eingeführt. Wegen der unterschiedlichen Schnittstellen (*Kpn* I/*Bam*H I) kann das Fragment nur in einer möglichen Orientierung kloniert werden. Die Schnittstelle *Pvu* I diente als Kontrollschnittstelle für den erfolgreichen Einbau des Inserts SK-PH I (keine weiteren Daten dazu gezeigt).
- c) Schematische Darstellung von pBl KS(+) 2x SK. pBl KS(+) 2x SK entstand durch die Ligation von SK-PH I mit dem *Bam*H I/*Kpn* I verdauten pBl KS(+) (vgl. b). Die mit Stern gekennzeichnete, modifizierte *Bam*H I-Schnittstelle liess sich mit *Bam*H I nicht mehr schneiden. Zur Vereinfachung im folgenden Text wird die in der Abbildung gekennzeichnete Region (SK-Primer + nicht zu hybridisierende Sequenz) mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Daraus ergibt sich die Schemazeichnung

für pBl KS(+) 2x SK wie unter d) gezeigt.

- d) Vereinfachte Darstellung von pBl KS(+) 2x SK. Durchgezogene schwarze Linie steht für das MCS, die unterbrochene Linie für den verbleibenden Vektor pBl KS(+). Die schwarzen Pfeile zeigen die 5'→3' Richtung der klonierten SK-Primer zuzüglich 4 bp nicht zu hybridisierende Sequenz an (vgl. c).

**Figur 2: Vereinfachte schematische Darstellung von pBl KS(+) 7x SK.**

Der Vektor pBl ist durch eine unterbrochene, schwarze Linie gekennzeichnet; in seiner *Kpn* I/*Sac* I orientierten MCS sind jetzt sieben SK-Primersequenzen enthalten. Das SK-PH II-Fragment (gestrichelter Pfeil oben und durch Linien hervorgehobene Sequenz "SK-PH II" unten) fügte den siebten SK-Primer und die zusätzliche *Eag* I-Schnittstelle in den Vektor ein. Die wichtigen Sequenzen sind detailliert herausgehoben. Die SK-Primer-Sequenz ist hellgrau unterlegt, das restliche MCS und der 4-Basen-Spacer dunkelgrau. Die Schnittstellen sind in der Sequenz mit fein unterbrochenen, schwarzen Linie gekennzeichnet.

**Figur 3: Schematische Darstellung der Klonierung eines pBl2x Block-Plasmids**

- a) Insertion eines 7x SK-Blocks in die *Not* I-geöffnete pBl 1x Block-DNA. Die Kennzeichnung der einzelnen Komponenten ist identisch mit denen unter Fig. 1 bzw. Fig. 2. Der Klon pBl 1x Block wurde mit dem Enzym *Not* I linearisiert und mit dem, zuvor mit *Eag* I nachgeschnittenen, PCR-Fragment ligiert. Zur Vereinfachung im weiteren Text werden die sieben SK-Fragmente zu einem grauen Pfeil zusammengefaßt.
- b) Darstellung der Übergänge zwischen einzelnen Blöcken. Die Kennzeichnung der Komponenten ist vergleichbar mit der in Fig. 1.a-d. Durch die Ligation des 7x SK-Block (grauer Pfeil) in der richtigen Orientierung wurde die *Not* I-Schnittstelle, die zuvor pBl 1x Block öffnete, durch das 5'-Ende des neu hinzugekommenen 7x SK-Blocks maskiert



(fette Buchstaben) und durch Not I nicht mehr schneidbar. Das 3'-Ende des Fragments komplettiert die Not I-Schnittstelle in Richtung Vektor. Dadurch wird es in der nächsten Klonierungsrunde möglich, pBl 2x Block wieder mit Not I zu linearisieren, ohne Verlust der 14 SK-Primer. Die BamH I-Schnittstelle am 5'-Ende eines 7x Blocks bleibt, im Gegensatz zu der BamH I-Schnittstelle zwischen den einzelnen SK-Primern im Block (BamH I\*), erhalten (BamH I) und kann später als Orientierungskontrolle eingesetzt werden.

**Figur 4: Sequenzierungsergebnis des 27 SK-Primerelements enthaltenden Plasmidkonstrukts**

Schwarze Balken markieren die SK-Primersequenzbereiche in der von beiden Seiten sequenzierten repetitiven Region. Zwischen diesen SK-Primersequenzbereichen liegen aus klonierungstechnischen Gründen die 4 Basenpaare langen Abfolgen ATCT oder GCCG.

**Figur 5: Schema des Markierungsexperiments**

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung näher.

**Beispiel**

Die nachstehend dargestellten Verfahren zur Herstellung der Repetitionen enthaltenden Plasmide sind in Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (Molecular cloning; a laboratory manual; second edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) und in Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, 1994-1998) beschrieben, wobei die nachfolgenden Techniken, wie DNA-Vermehrung Restriktionsendonukleasenverdau, Ligation, Agarosegelelektrophorese, PCR dem Fachmann hinreichend bekannt sind und beherrscht werden.

Für die Repetition wurde das SK-Primer-Element von pBluescript

(Fa. Stratagene, Heidelberg) ausgewählt, weil es keine selbst-komplementären oder homooligomeren Bereiche enthält, mit einem G/C-Gehalt von 50% im Durchschnittsbereich natürlicher DNA liegt und klonierungstechnisch zur annähernd lückenlosen Herstellung direkt repetitiver Bereiche günstig ist. Ausserdem ist von Vorteil, daß diese Region mit einem komplementären Sequenzierprimer (mit dem hier beschriebenen SK-Primer identisch) zuverlässig und stabil hybridisiert, da sie von der Firma Stratagene (Heidelberg) als Sequenzierprimer-Bindestelle konzipiert worden ist.

Zum Zweck der Konstruktion von SK-Primersequenzelementen in repetitiver Folge wird ein kurzes Oligonucleotid-Fragment benötigt, in dem die SK-Primersequenz sowie Schnittstellen zur Durchführung der Klonierungen enthalten sind. Hierfür wurden zueinander komplementäre Oligonukleotide synthetisiert. Diese ss-DNA-Fragmente wurden durch Hybridisierung zu klonierbaren ds-Fragmenten umgewandelt, indem die beiden komplementären Oligonukleotide äquimolar in 10 mM Tris-Puffer aneinandergelagert werden. Die Erfolgskontrolle stellt die gelungene Klonierung dar. Die so entstandenen Fragmente wurden SK-PH I (SK-Primer-Hybrid I; Fragment, das für die SK-Primervermehrung von 2-6 SK-Primersequenzen genutzt wurde, vgl. Abb.1) und SK-PH II (SK-Primer-Hybrid II; Fragment, das den siebten SK-Primer und die *Eag* I-Schnittstelle einführte, vgl. Abb.2) genannt.

Für die Herstellung des Plasmids pBl KS(+) (pBluescript KS(+)) mit zwei SK-Primern (pBl KS(+) 2x SK) mußte pBl KS(+) mit *Bam*H I und *Kpn* I geöffnet werden, wobei ein Teil der multiplen Klonierungsstelle MCS entfernt wurde (Abb.1 a). Der vollständige Doppelverdau wurde auf einem 2%-Agarosegel nachgewiesen. Es folgte eine Ethanol-fällung. Das Insert SK-PH I (Abb.1b) wurde in einem 10 fachen Überschuß zum geöffneten Vektor zur Ligation gegeben (s. Abb.1 b). Diesen hohen Überschuß konnte man deshalb verantworten, da die 5'-Enden des Fragments nicht phosphoryliert waren, also keine

Oligomere der Inserts entstehen konnten. Mit diesem Ligationsansatz wurde die Transformation in *E. coli*, z.B. XL1-Blue durchgeführt. Von den gewachsenen Kolonien wurde zur Klonierungskontrolle aus drei Klonen die Plasmid-DNA durch Mini-Präparation isoliert. Die so gewonnenen Klone werden nachfolgend pBl KS(+) 2x SK (Abb.1.c) genannt.

Die weitere Klonierung von Plasmiden mit bis zu sieben in gleicher Orientierung enthaltenen SK-Elementen war zeitaufwendig, da jeweils ein Klon aus der letzten Klonierungsrunde als Grundlage für die nächste Klonierung diente. Dementsprechend wurde die Midi-Präp-DNA des ausgewählten pBl 2x SK-Klons wiederum *BamH* I/*Kpn* I doppelverdaut und mit SK-PH I versetzt, ligiert und in *E.coli* XL1-Blue transformiert. Abweichend von der für die Klonierung von pBl 2x SK benutzten Strategie mußte nun in besonderem Maß auf einen effizienten Doppelverdau mit *BamH* I und *Kpn* I geachtet werden. Wie Abb.1.c zeigt, lagen die Schnittstellen, in die ein weiteres SK-PH I-Fragment integriert werden sollte, nämlich nur sechs Basenpaare voneinander entfernt. Ein derartig geringer Abstand zweier Restriktionsschnittstellen läßt die gleichzeitige Restriktion beider Schnittstellen nicht zu. Es mußte dementsprechend nacheinander mit beiden Enzymen geschnitten werden. In dieser Weise wurden die Klonierungen bis zum Plasmid pBl KS(+) 6x SK durchgeführt.

Nach der Klonierung der siebten SK-Primersequenz erfolgte die Vermehrung der repetitiven Elemente blockweise. Dies konnte nur funktionieren, wenn es eine Schnittstelle gab, die den Bereich mit sieben SK-Primern als Einheit vom Vektor trennte. Durch die Ligation des SK-PH II (Abb. 2) in pBl 6x SK wurde dies ermöglicht. SK-PH II brachte neben dem siebten SK-Element die neue Schnittstelle *Eag* I in den Vektor ein. Jetzt wurden die sieben SK-Primer von zwei *Eag* I-Schnittstellen begrenzt (Abb.2) weil der Ausgangsvektor pBl KS(+) bereits eine solche Schnittstelle im MCS mitbrachte.

Zur Beschleunigung der weiteren Klonierungsschritte erfolgte die blockweise Vermehrung der SK-Elemente mittels der Polymerase Chain Reaction (PCR). Als Template-DNA für die Amplifizierung des Fragments mit sieben repetitiven Elemente wurde die Plasmid-Präparation aus XL1-Blue genommen, die  
5 direkt aus der Originalkolonie abstammte (pBl 7x SK). Bei der ersten Optimierung der PCR sollte herausgefunden werden, welches Primerpaar das Zielfragment mit der besten Qualität und Quantität amplifizierte. Es wurden die Primer M13, M13  
10 reverse, T3 und T7 (M13: TGTAACGACGGCCAGT; M13 reverse: CAGGAAACAGCTATGACC; T3: AATTAACCCTCACTAAAGGG; T7: TAATACGACTCACTATAGGG) in verschiedenen Kombinationen miteinander ausgetestet. Alle diese Primer hatten ihre Bindungsstellen außerhalb der MCS, entweder nahe des  $\beta$ -Galaktosidase  
15 Startpunkts oder nahe der T7-Transkriptions-Startstelle in pBluescript KS (+). Die PCR fand unter Standardbedingungen statt. Die verschiedenen Ansätze enthielten die zueinander passenden Primer in den verschiedenen möglichen Kombinationen: M13/M13 reverse, T7/T3, T7/M13 reverse und T3/M13. In der  
20 Negativkontrolle waren alle vier Primer ohne das Template vereinigt. Da der PCR-Ansatz mit T3/T7 die besten Ergebnisse lieferte, wurde dieses Primerpaar für die PCR gewählt.

Um das mittels PCR gewonnene Insertfragment in den mit *NotI*  
25 geöffneten Vektor ligieren zu können, mußte es "sticky ends" besitzen, die mit *Not I* kompatibel waren. Hierfür mußte das PCR-Fragment, das die sieben SK-Primer enthielt, an den Rändern nachgeschnitten werden. Das Restriktionsenzym *Eag I* verkürzte das 246 bp lange PCR Fragment, dessen Ränder die  
30 Sequenzen der Primer T3/T7 abschlossen, um 47 und um 51 bp auf der anderen Seite. Mit einem 2,2 %igen Gel konnte dieser Unterschied zur Kontrolle noch sichtbar gemacht werden. Mit dem durch die PCR amplifizierten 7x SK-Fragment, dessen Ränder durch den *Eag I*-Verdau zu *Not I* kompatibel wurden, wurde  
35 pBl KS(+) 7x SK in nur einem Schritt zu pBl KS(+) 14x SK. Für einen Überblick der Klonierungsweise siehe Abb.3. Das verdauete Fragment wurde vor der Ligation durch den PCR-Purification Kit

(Fa. Qiagen) gereinigt. Dies sollte die nicht in der PCR-Reaktion verbrauchten Primer und die durch den Verdau entstandenen Bruchstücke entfernen.

5      Gegenüber den ersten Klonierungsschritten, die zu  
pBl KS(+) 7x SK führten, wurde der Vektor nicht mit zwei  
verschiedenen Enzymen (*Kpn* I/*Bam*H I vgl. Abb 1) geöffnet  
sondern mit *Not* I linearisiert. Deshalb mußte mit einer  
Häufung an Religationen gerechnet werden. Bei dieser  
10      Klonierung konnte einer Religation nicht durch eine vielfach  
erhöhte Insertkonzentration (7x SK-Fragment) entgegengewirkt  
werden, da die DNA-Blöcke an den 5'-Enden phosphoryliert waren  
und mit unkontrollierbaren Oligomerisierungen der Insert-DNA  
zu rechnen war. Die Religationen wurden deshalb durch eine  
15      Dephosphorylierung des Vektors reduziert oder sogar  
verhindert. Im Verlauf der weiteren Ausführungen wird die  
bisher pBlKS(+)7xSK genannte DNA als pBl 1xBlock bezeichnet.

20      Der mit *Not* I geöffnete pBl 1x Block wurde mit dem gereinigten  
PCR-Fragment ligiert, das ebenfalls sieben SK-Primer enthielt.  
Dies wurde durch die am Rand der repetitiven Elemente  
befindlichen einzigen *Not* I-Schnittstelle möglich, durch die  
der pBl 1x Block linearisiert wurde. Das PCR-Fragment wurde,  
wie oben erwähnt, mit dem zu *Not* I kompatiblen Enzym *Eag* I  
25      nachgeschnitten und direkt an die sieben SK-Primer des Vektors  
ligiert (pBl 2x Block).

30      Da sich pBl 7x SK im Wirtsstamm JM110 als stabil erwies, wurde  
auch der Ligationsansatz des Plasmids mit 14 SK-Elementen in  
diesen Stamm transformiert. Die Transformation von  
pBl KS(+) 14x SK in JM110 brachte 118 Transformanten hervor.  
Dies entsprach einer Transformationsrate von  $1,7 \times 10^3$  cfu  
(colony forming units)/ $\mu$ g DNA.

35      Es wurde weiter mit schrittweiser Vermehrung gearbeitet, in

diesem Fall mit dem Ziel, mit den 7x SK-Blöcken ein Plasmid mit 28 repetitiven SK-Primersequenzen aufzubauen. Hierfür wurde, analog wie in Abb. 3 gezeigt, pBl 2x Block mit *Not* I linearisiert. Der vollständige Verdau wurde auf einem 1 %igen Agarosegel überprüft. Die 5'-Enden dieses mit *Not* I geöffneten Plasmids wurden dephosphoryliert und mit dem 7x SK-Block ligiert. Aus der Transformation resultierten sieben Kolonien.

Der Kontrollverdau mit *Bam*H I mehrerer Kandidaten-Klone ergab, daß ein kompletter 7x SK-Block zusätzlich insertiert worden war. Einer der Klone wurde für eine Midi-Präparation vermehrt und die DNA präpariert. Die Sequenzanalyse aus dieser Midi-Präparation bewies die komplette und korrekte Sequenz von 21 SK-Primern mit den funktionsfähigen Schnittstellen, die für die nächste Klonierung benötigt wurden. Die Gelanalysen wurden dabei bestätigt. Dieser Klon wird im folgenden Text mit pBl 3x Block bezeichnet. Er diente als Vorstufe für die nächste Insertionsrunde.

Um zu einem Plasmid mit 28 repetitiven SK-Elementen zu gelangen, wurde die blockweise Vermehrung des 7x SK-Blocks fortgeführt. Als Ausgangsplasmid dieser Klonierung wurde pBl 3x Block eingesetzt. Diese Klonierung wurde wie die beiden vorangegangenen behandelt. pBl 3x Block wurde mit *Not* I linearisiert, auf vollständigen Verdau in einem 1 %igen Agarosegel überprüft und danach dephosphoryliert. Der dephosphorylierte Vektor wurde zusammen mit dem in der PCR amplifizierten und nachgeschnittenen 7x SK-Block in einen Ligationsansatz eingesetzt. Die Kontrolligation zur Beurteilung der Dephosphorylierung erbrachte 2 Klone. Bei der Transformation der Ligation mit Insert entwickelten sich 59 Klone, davon wurden 16 Kolonien für eine Mini-Präparation ausgewählt. Die Auftrennung mit einem Agarosegel nach einem *Sac* I/*Kpn* I-Verdau erfolgte wie gewöhnlich auf einer 2,2 %igen Gelmatrix.

Insgesamt 5 Klone wiesen verlängerte Insertbereiche auf. Kontrollverdaus mit *Bam*H I sowie Dreifachverdaus mit *Sac* I/*Kpn* I/*Bam*H I zeigten Fragmentemuster, die darauf hindeuteten, dass kein kompletter 7x SK-block hinzugekommen sein dürfte. Stattdessen musste bei der Klonierung eine *Bam*HI-site im neu hinzugekommenen Block deletiert worden sein.

Von den fünf sich gleichenden Klonen wurde einer ausgewählt und mit seiner midi-präparierten DNA eine Sequenzanalyse durchgeführt. Die Sequenzierung bestätigte das Ergebnis, daß die neu dazugekommene *Bam*H I-Schnittstelle deletiert war. Es fehlte der komplette SK-Primer mit intakter *Bam*HI-Schnittstelle des zuletzt hinzugekommenen 7x SK-Blocks. Das Ergebnis war also ein pBl KS(+) Plasmid mit 27x SK Primern. Die Sequenz dieses Klons ist in Figur 4 gezeigt.

**Patentanspruch**

- 5 1) Plasmid, dadurch gekennzeichnet, daß es sich von pBluescript KS(+) ableitet und mehr als 1 repetitives SK-Primersequenzelement enthält.
- 10 2) Plasmid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es 2, 7, 14, 21 oder 27 repetitive SK-Primersequenzelemente enthält.
- 15 3) Plasmid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Primersequenzelemente einen Markerkomplex tragen.
- 20 4) Plasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das SK-Primersequenzelement folgende Sequenz umfaßt:  
5'-GATCCACTAGTTCTAGAGCG-3'
- 25 5) Plasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß daran SK-Oligonukleotide gebunden werden können, die an ihren Enden durch ein im Elektronenmikroskop detektierbares Element modifiziert sind.
- 30 6) Plasmid nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Elemente ausgewählt sind aus Bor, Silizium, Eisen oder Mangan.
- 7) Verwendung eines Plasmids nach einem der Ansprüche 1 bis 6 in der analytischen Elektronenmikroskopie.
- 35 8) E. coli Zellen, transformiert mit einem Plasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
- 9) E. coli Zellen nach Anspruch 8, dadurch

gekennzeichnet, daß es sich um E. coli JM110 handelt.

10) Testkit zur Verwendung in der Elektronenmikroskopie,  
umfassend mindestens die

5

folgenden Komponenten:

- kompetente E. coli JM110-Bakterienzellen zur  
Vermehrung eines Plasmides nach einem der  
Ansprüche 1 bis 5,

10

- einzelsträngige Plasmide umfassend 2x, 7x, 14x, 21x  
und 27x SK.



1/6

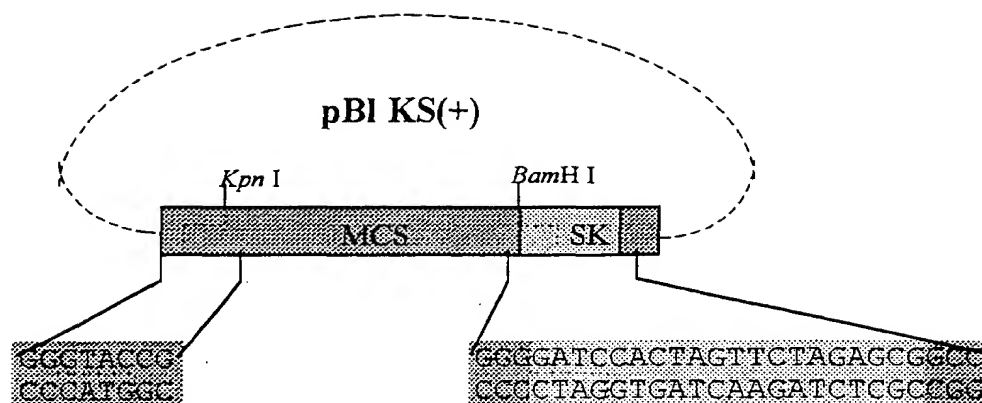


Fig. 1a

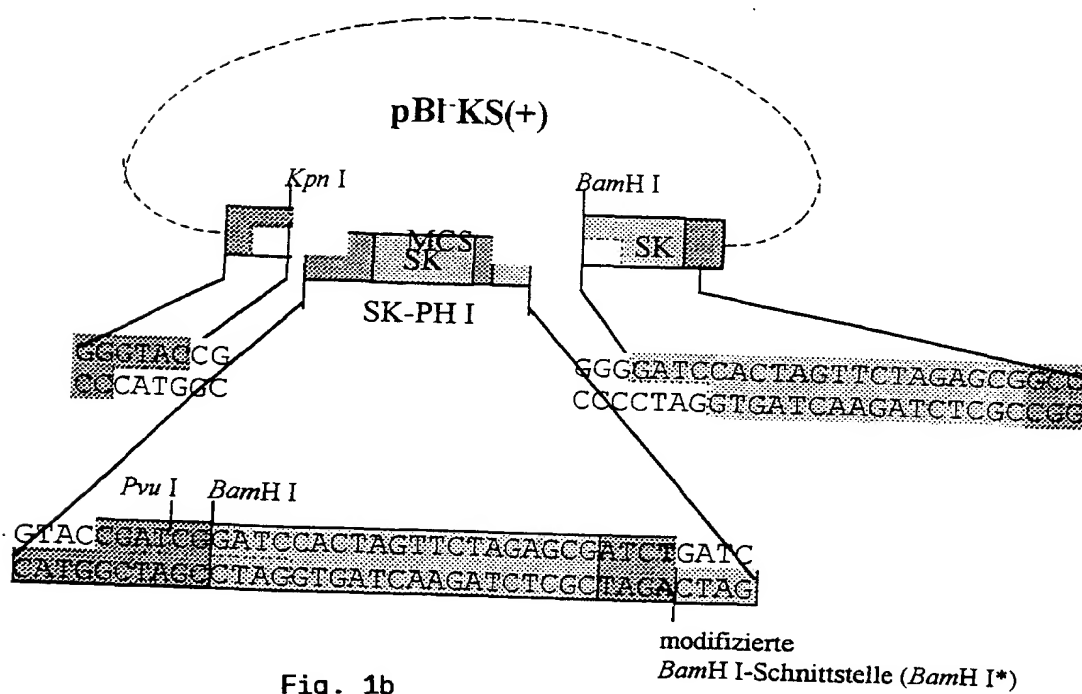


Fig. 1b



2/6

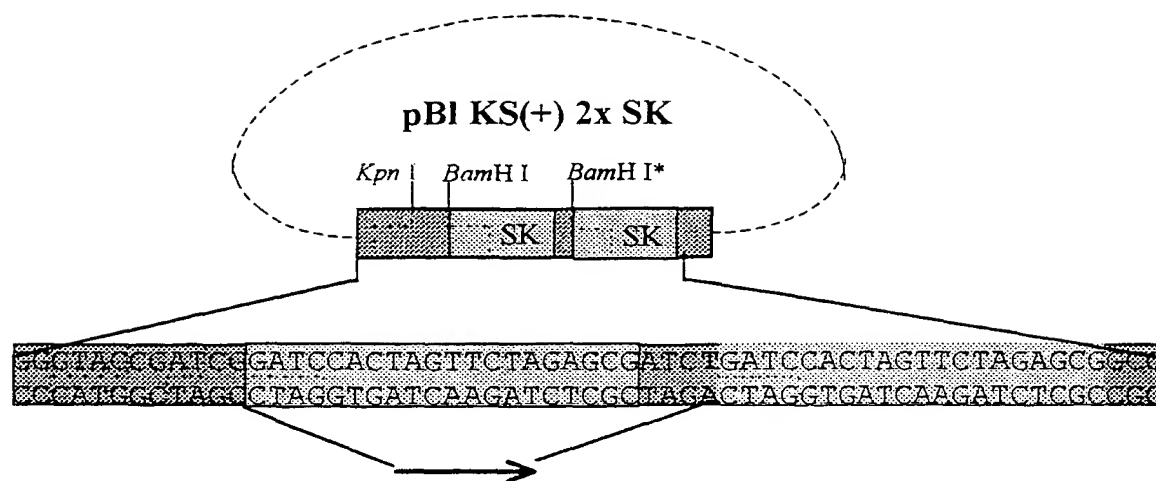


Fig. 1c

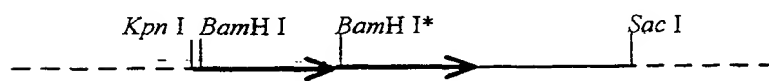


Fig. 1d



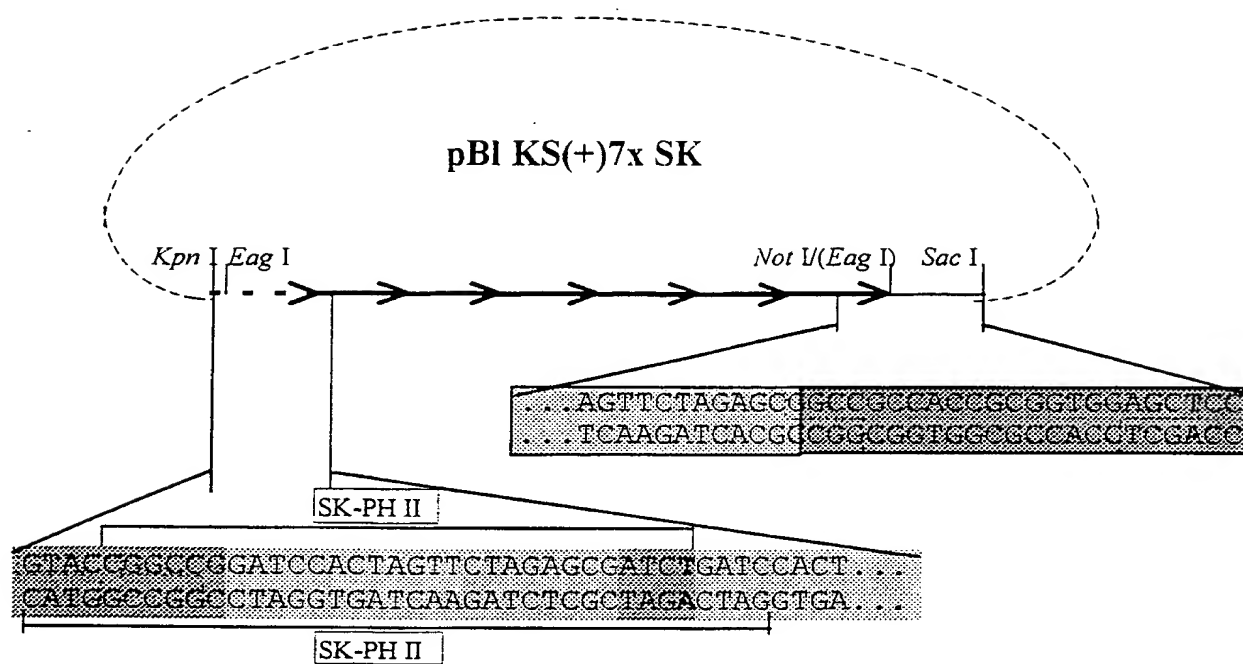
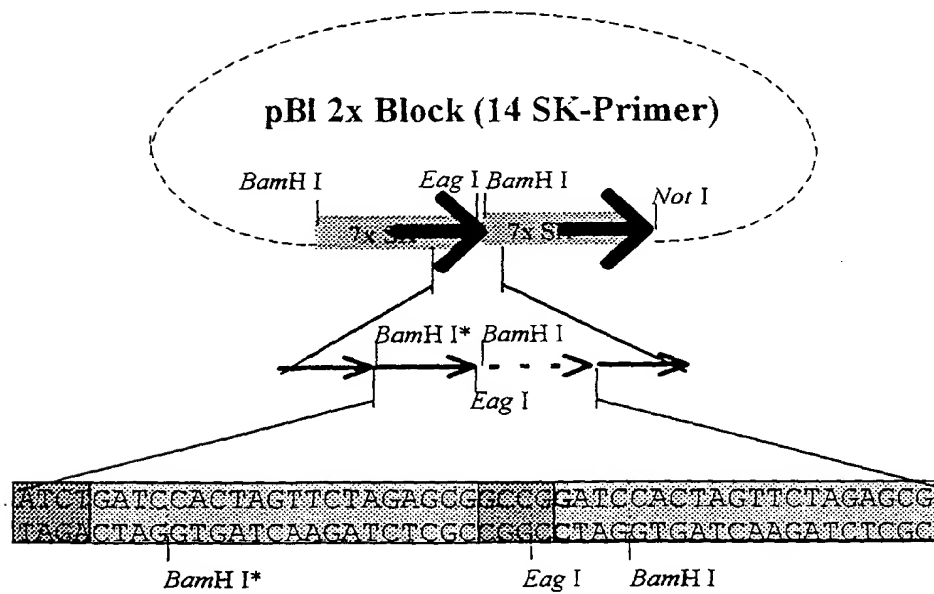
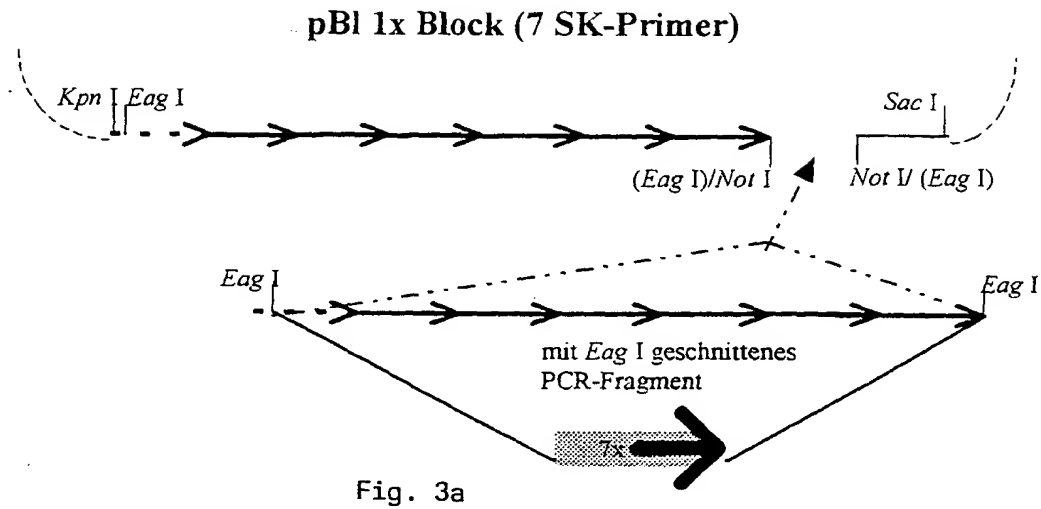


Fig. 2









5/6

AGCTCGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGTACCGGCCGGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACT 80  
TCGAGCTTTAATTGGGAGTGATTTCCCTTGTTTTCGACCATGGCCGGCCTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGA

AGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAG 160  
TCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATC

AGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCT 240  
TCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCCGGCCTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGA

GATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACT 320  
CTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGA

AGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGGATCCACTAGTTCTAG 400  
TCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCCGGCCTAGGTGATCAAGATC

AGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCT 480  
TCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGA

GATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACT 560  
CTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGA

AGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAG 640  
TCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATC

AGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGATCTGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAAT 717  
TCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCTAGACTAGGTGATCAAGATCTCGCCGGCGGTGGCGCCACCTCGAGGTTA

Fig. 4

•

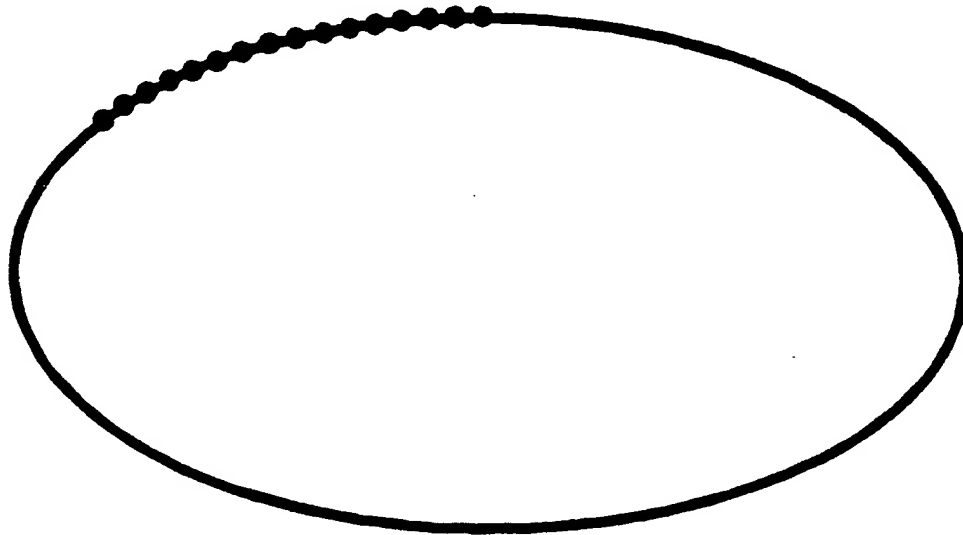
•

•

•

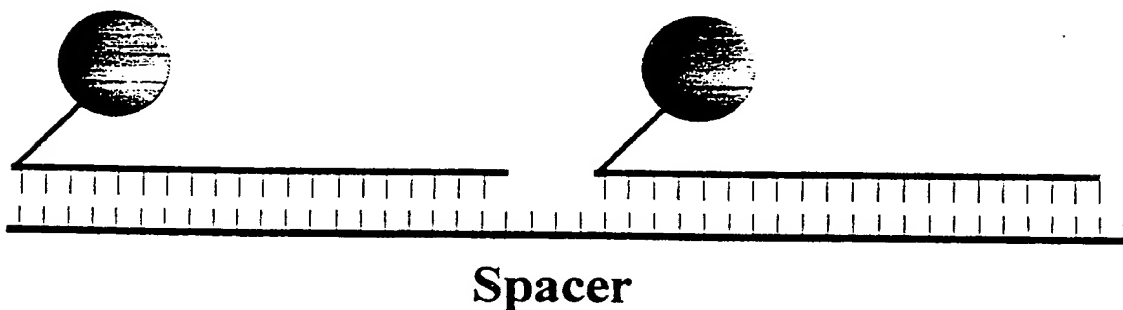
## **Schema des Markierungsexperimentes:**

Übersicht:



Plasmid (blau) mit 16 repetitiven Sequenzen, an die der ESI-Marker (rot) bindet

Detail:



Der ESI-Marker (rot) ist an ein einzelsträngiges Oligonucleotid (grün) kovalent gebunden. Das Oligonukleotid assoziiert durch komplementäre Basenpaarung (Hybridisierung) mit den repetitiven Sequenzen des Plasmids (blau). Die repetitiven Sequenzen sind in diesem Beispiel 20 Nucleotide lang und durch einen Spacer von 4 Nucleotiden getrennt.

Fig. 5

•  
•  
•

f  
•  
•  
•